

ณรงค์ฤทธิ์ สกุลโพธิ์ : การปรับปรุงประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมโดยใช้ไฮโดรเจนออกไซด์เชิงแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (IMPROVEMENT OF BRADYRHIZOBIAL INOCULANT EFFICIENCY BY USING H_2 -OXIDIZING PGPR) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรรณลดดา คิตตะบุตร, 77 หน้า.

หัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมมีบทบาทสำคัญในการปลูกพืชตระกูลถั่ว ทั้งนี้หัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมควรมีปริมาณเซลล์มีชีวิตที่สูง เพื่อให้สามารถแข่งขันเข้าสร้างปมกับหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมท้องถิ่นได้ งานวิจัยนี้พบว่า หัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมท้องถิ่นที่พบในดินในประเทศไทยมักจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในระดับต่ำ แต่มีความสามารถในการแข่งขันเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองที่สูงกว่าหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ใช้เป็นการค้า โดยหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมท้องถิ่นที่คัดแยกได้จากดินส่วนใหญ่ (ร้อยละ 69) ไม่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hup) ที่สามารถตรึงไฮโดรเจน (H_2) กลับมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นไฮโดรเจนซึ่งเป็นของเหลือจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ จะถูกปลดปล่อยออกมาจากปมถั่วที่ถูกสร้างโดยหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมท้องถิ่น (Hup) ในปริมาณมาก พบว่าก๊าซไฮโดรเจนที่ปลดปล่อยออกมาไม่มีผลกระทบโดยตรงต่อการส่งเสริม การเจริญของพืช รวมทั้งไม่มีผลกระทบโดยตรงต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียม ที่สามารถนำก๊าซไฮโดรเจนกลับไปใช้ในเซลล์ใหม่ได้ (Hup⁺) แต่พบว่าก๊าซไฮโดรเจนที่ปลดปล่อยออกมาอาจมีประโยชน์ต่อกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรอบรากพืช ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถนำก๊าซไฮโดรเจนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ ดังนั้นจึงเป็นอีกทางหนึ่งในการใช้ (Hup⁺ PGPR) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง วัตถุประสงค์โดยรวมของงานวิจัยนี้คือการคัดเลือก PGPR ที่มีคุณสมบัติเป็น Hup⁺ ที่มีประสิทธิภาพต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช เช่น การสร้าง indole-3-acetic acid (IAA) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase เมื่อนำหัวเชื้อ PGPR นี้ ใช้ร่วมกับหัวเชื้อ *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 โดยเชื้อ Hup⁺ PGPR ที่คัดเลือกได้ถูกนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองในสภาวะทั้งที่ไม่ใช้ หรือใช้ร่วมกับแบคทีเรียไรโซเบียม Hup⁺ และ Hup⁻ ผลการทดลองพบว่าการใช้เชื้อ Hup⁺ PGPR สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีการให้ก๊าซไฮโดรเจน หรือให้อากาศ โดยเชื้อ Hup⁺ PGPR สายพันธุ์ 2H17 (*Bacillus* sp.) และ H39 (*B. megaterium*) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง ที่ปลูกภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าการปลูกภายใต้สภาวะใช้อากาศ

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ระดับของการสร้าง IAA ในเชื้อสายพันธุ์ H39 ยังเพิ่มขึ้นเมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไฮโดรเจน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ PGPR สายพันธุ์ H39 สามารถนำก๊าซไฮโดรเจนไปใช้ได้จริง และมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองในสภาวะที่มีไฮโดรเจน อย่างไรก็ตาม พบว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์ H39 (Hup⁺ PGPR) ร่วมกับ *B. diazoefficiens* USDA110 Hup⁺ ไม่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองได้ แต่เมื่อใช้ร่วมกับ *Bradyrhizobium* sp. PC-5 Hup⁻ ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมท้องถิ่นที่ไม่สามารถตรึงไฮโดรเจนกลับเข้าสู่เซลล์ได้ สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองได้ และเมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ H39 ใช้ร่วมกับ *B. diazoefficiens* USDA110 ภายใต้สภาวะที่มีการแข่งขันเข้าสู่สร้างปมกับเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. PC-5 Hup⁻ พบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองได้เช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อสายพันธุ์ H39 ไปใช้ร่วมกับหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพหัวเชื้อไรโซเบียมในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลือง เมื่อนำไปใช้ในสภาพไร่ ที่มักพบการแข่งขันเข้าสู่สร้างปมกับเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมท้องถิ่น ที่ไม่มีความสามารถในการตรึงไฮโดรเจนกลับเข้ามาใช้ในเซลล์ (Hup⁻)



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

NARONGRIT SAKUNPON : IMPROVEMENT OF BRADYRHIZOBIAL
INOCULANT EFFICIENCY BY USING H₂-OXIDIZING PGPR. THESIS
ADVISOR : ASSIST. PROF. PANLADA TITTABUTR, Ph.D., 77 PP.

SOYBEAN/*BRADYRHIZOBIUM*/HYDROGENASE UPTAKE/PGPR

Bradyrhizobial inoculants play an important role in legume production. High amount of effective *Bradyrhizobium* should be inoculated onto the seed to compete with indigenous bradyrhizobia in order to ensure the successful nodulation. This study found that most indigenous bradyrhizobia in Thai soil exhibit low nitrogenase activity, while they have high ability to compete in the nodulation with the commercial strain. From this study, 69% of isolated indigenous bradyrhizobia lacked hydrogenase uptake ability (Hup⁻). Thus, high amount of H₂ which is the by-product of biological nitrogen fixation would be released from nodules. It was found that H₂ did not have a direct effect on soybean growth and nitrogenase activity of *Bradyrhizobium* containing hydrogenase uptake ability (Hup⁺). On the other hand, H₂ released from Hup⁻ nodule would benefit plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that contain uptake hydrogen (H₂) (Hup⁺ PGPR) as extra energy and support soybean growth. Therefore, the overall objectives of this study were to select effective Hup⁺ PGPR and determine their efficiency when they were co-inoculated with effective *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 on soybean growth. PGPR were selected on the basis of their ability to uptake H₂, indole-3-acetic acid (IAA), and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase production. The efficiency of the selected PGPR on soybean growth promotion was evaluated *in vitro* under non-symbiosis and co-inoculated with Hup⁺ or Hup⁻ bradyrhizobia. The results

demonstrated that most of PGPR could promote soybean growth both under H₂ and air treated conditions. H39 (*B. megaterium*) and 2H17 (*Bacillus* sp.) were two Hup⁺ PGPR isolates found to be able to significantly increase plant growth under H₂ treated condition. In addition, the level of IAA production of isolate H39 was increased under H₂ treated condition. These results indicated that isolate H39 could uptake H₂ and potentially promote soybean growth in the presence of H₂ gas. Although co-inoculation of *B. diazoefficiens* USDA110 with isolate H39 could not promote plant growth, co-inoculation of isolate H39 with *Bradyrhizobium* sp. PC-5 Hup⁻ (indigenous bradyrhizobium) increased growth of soybean. The same result was also found under the competitive condition between USDA110 and PC-5. Therefore, Hup⁺ PGPR isolate H39 can be applied as co-inoculant PGPR with bradyrhizobial inoculant to increase the efficiency of inoculum and promote soybean growth under natural competition in the fields.

School of Biotechnology

Academic Year 2014

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____